

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. G. G. Wendt

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des
Y-Chromosoms in hochspannungselektrophoretisch
aufgetrennten Spermien

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Elfi Mesenbrink, geb. Mende
aus Recklinghausen

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des
Y-Chromosoms in hochspannungselektrophoretisch
aufgetrennten Spermien

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Elfi Mesenbrink, geb. Mende

aus Recklinghausen

Marburg 1973



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 17.7.1973

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Professor Dr. med. H. Oepen

Referent: Professor Dr. med. H. Oepen

Correferent: Prof. Dr.med.dent. H. Schnell

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	5
B. MATERIAL UND LABORBEDARF	6
I. Untersuchtes Material	6
II. Apparate	7
III. Laborbedarf	8
C. METHODIK UND ERGEBNISSE	10
I. Darstellung des Y-Chromosoms in nativen Spermien	10
II. Trennversuche mit der Hochspannungs- elektrophorese	12
III. Darstellung des Y-Chromosoms nach der Elektrophorese	16
D. DISKUSSION	21
E. ZUSAMMENFASSUNG	29
F. ANHANG	30
G. LITERATURVERZEICHNIS	36



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0024

A. EINLEITUNG

BRIDGES' Versuche mit *Drosophila melanogaster* haben schon 1932 gezeigt, daß ein chromosomaler Unterschied besteht zwischen Spermien, die männliche, und solchen, die weibliche Individuen determinieren. Später ist immer wieder versucht worden, eine brauchbare Methode zur Trennung dieser beiden Zellarten zu entwickeln: Durch Zentrifugieren (2,3,12), Elektrophorese (11,14,21,25,28,29) oder Sedimentation (4,22-24). Tierexperimentell erwies sich die Trennung durch die beiden zuletzt genannten Methoden nach Inseminationstests mit den verschiedenen Fraktionen zum Teil als erfolgreich. Da beim Menschen derartige Kontrollmöglichkeiten aus ethischen Gründen nicht gegeben sind, blieben viele Probleme dieser Forschungsrichtung lange Zeit ungelöst.

ZECH (30) gelang es nun 1969 erstmalig, das Y-Chromosom nach Atebrinfärbung mit Hilfe der Fluoreszenztechnik praktisch isoliert darzustellen. Dadurch ist es möglich geworden, Trennmethode für die X- bzw. Y-Chromosomen-Träger unter den menschlichen Samenzellen auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen.

Es lag deshalb nahe,

1. die bis zum Beginn dieser Arbeit beschriebenen Methoden der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Y-Chromosoms in frischen Spermien zu nutzen, dann
2. festzustellen, ob diese Methoden auch nach einem Durchgang der Spermien durch die Hochspannungselektrophorese zu befriedigenden Ergebnissen führen, und schließlich
3. die Verteilung der Y-Chromosomen-tragenden Spermien im elektrischen Feld zu prüfen.

B. MATERIAL UND LABORBEDARF

I. Untersuchtes Material

Alle in meiner Arbeit zu Vor- und Hauptversuchen benutzten 35 Spenderproben stammten aus der andrologischen Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik Marburg. Bei den Ejakulaten handelt es sich um Normospermien. Eine gewisse Schwankungsbreite wurde toleriert (s. Tab. 1), weil bei der Materialbeschaffung größere Schwierigkeiten auftraten. Da nie vorausgesagt werden konnte, ob an bestimmten Tagen normale Ejakulate anfallen würden, mußten über einen größeren Zeitraum täglich alle Versuchsvorbereitungen getroffen werden. Im Durchschnitt stand nur alle 4-5 Tage brauchbares Sperma zur Verfügung. Deshalb war der Aufwand an Zeit und Geld (siehe C II) erheblich.

Tab.1: Daten zur Beschaffenheit der Spermaproben

	<u>Versuch</u>				
	I	II	III	IV	V
<u>EJAKULAT:</u>					
Spermienalter p.E. zur Zeit der Messung in min	30	30	35	40	960
Menge in ml	2,0	4,0	3,0	5,0	6,5
Spermien in Mill/ml	90	60	29	110	150
pH-Wert	7,3	7,2	7,5	7,2	7,1
Vitalität in %	72	76	71	74	22
Anteil toter Spermien in %	14	17	15	26	83
Fehlformen in %	10	6	16	8	12

	<u>Versuch</u>				
	I	II	III	IV	V
Fruktosegehalt in ml	2835	3470	6250	4635	1000
Spenderalter in J	27	27	30	32	28
	VI	VII	VIII	IX	X
<u>Ejakulat:</u>					
Spermienalter p.E. zur Zeit der Messung in min	960	90	90	30	45
Menge in ml	6,5	3,5	3,5	2,5	2,0
Spermien in Mill/ml	150	60	60	140	190
pH-Wert	7,1	7,4	7,4	7,2	7,2
Vitalität in %	22	70	70	62	90
Anteil toter Spermien in %	83	26	26	36	45
Fehlformen in %	12	16	16	10	10
Fruktosegehalt in ml	1000	3523	3523	1845	2670
Spenderalter in J	27	27	27	32	27

II. Apparate

- Elektrophoreseapparatur (Elphor Va PII-Gerät der Fa. Bender & Hobein GmbH, München)
- pH-Meter der Fa. Radiometer, Kopenhagen, Type PHM 4c
- Christ-Zentrifuge, Typ UJ 1S
- Substanzwaage der Fa. Sartorius mit einer Meßgenauigkeit von 0,01 mg
- Kamera Typ Leica M3, Film der Fa. Ilford Pan F 135, 18 Din
- Fluoreszenzmikroskop der Fa. Zeiss

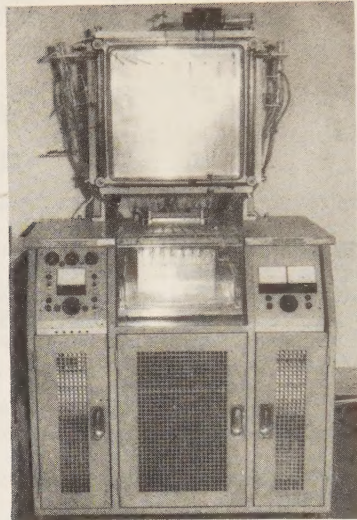


Abb.1: Elphor Va PII-Elektrophoreseapparatur

III. Laborbedarf

- a) Standardacetat-Pufferlösung (0,2 m/ pH 4,62) der Fa. Merck, Darmstadt zur Eichung des pH-Meters
- b) Elektrodenpuffer (10):
 - 81,0 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
 - ad 3 l aqua bidest. mit 99%iger Essigsäure auf pH 7,8 eingestellt
- c) Kammerpuffer (10):
 - 0,446 g KCL
 - 1,0 g Glucose
 - 2,32 NaCl
 - 4,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

36,24 g Glycin

ad 2 l aqua bidest. mit 99%iger Essigsäure auf pH 7,8
eingestellt.

d) Phosphatpuffer zum Auswaschen und Eindecken (8):

0,1 m Citronensäure (43,1 Vol-Teile)

0,2 m Na_2HPO_4 (56,9 Vol-Teile)

e) Zur Fixierung:

Methanol-Eisessig, absteigende Alkoholreihe in Vorversu-
chen, absol. Äthanol in Hauptversuchen

f) Zur Färbung:

0,5%ige Atebrinlösung (Atebrin der Fa. Bayer-Leverkusen)

g) Neubauer-Zählkammer

h) CO_2 -Flasche

i) Reagenzgläser und Zentrifugenröhrchen

j) Pipetten, Meßzylinder, Bechergläser, Erlenmeyerkolben u.a.

C. METHODIK UND ERGEBNISSE

I. Darstellung des Y-Chromosoms in nativen Spermien

Das F-body - das nach BARLOW, VOSA (1) und ZECH (30) dem distalen Teil des langen Arms des Y-Chromosoms entspricht - ist fluoreszenzmikroskopisch deutlicher sichtbar als alle übrigen Teile des Spermiums. Einen Eindruck vermitteln Abb.2 und 3.

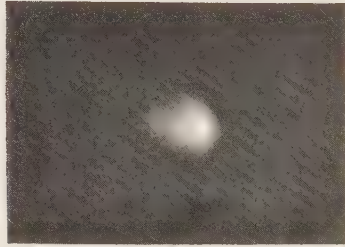


Abb.2:

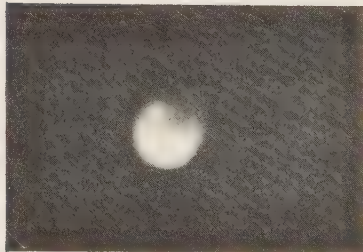


Abb.3:

Abb.2,3: Spermien mit je einem F-body

Der Spermienkopf enthält im basalen Drittel eine weitgehend homogen erscheinende gelb-grün angefärbte Masse. Davon scharf abgegrenzt sind die vorderen zwei Drittel des Kopfes, die kaum fluoreszieren. In dem Grenzbereich dieser beiden Regionen findet sich nun häufig ein sehr stark fluoreszierender rundlicher ca. 0,5 μ großer Körper: das F-body. Abweichend von seiner häufigsten Lage im Äquatorialbereich war der F-Körper gelegentlich auch im basalen oder vorderen Bereich des Kopfes lokalisiert. Bei jeder beschriebenen Lage konnte man ihn meist mittel-, manchmal aber auch randständig beobachten. Selten sah man Spermien mit zwei F-bodies (Abb.4).

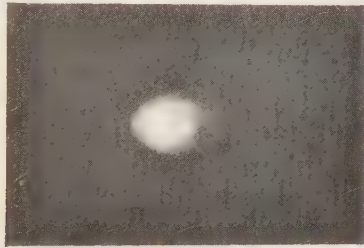


Abb.4: Spermium mit zwei F-bodies

Sie bleiben bei der Auszählung unberücksichtigt. In vielen Präparaten lagen mehrere Zellen dicht beieinander bzw. übereinander. Wegen entsprechender Überlagerungseffekte konnte man diese Spermien ebenfalls nicht auszählen. Zur Auswertung der einzelnen Präparate wurden bei willkürlich bewegtem Objektträgertisch 50 durch das Gesichtsfeld wandernde Spermien beurteilt. In Übereinstimmung mit BARLOW, VOSA (1) und PAWLOWITZKI, PEARSON (16) ergab sich bei den Auszählungen von

Nativpräparaten ein Verhältnis von ca. 40 - 45% Spermien mit einem F-body zu 55 - 60% F-body-freien Spermien.

II. Trennversuche mit der Hochspannungselektrophorese

Für eine trägerfreie Hochspannungselektrophorese stand mir ein Elphor Va PII-Gerät der Fa. Bender & Hobein zur Verfügung (s. Abb.1).

Zur Füllung der Trennkammer benutzte ich die oben genannte Kammerpufferlösung. Gleichzeitig diente dieser Puffer zur Herstellung einer Spermien suspension aus dem jeweils untersuchten Ejakulat, wobei die Konzentration auf 500 000 Spermien pro ml eingestellt wurde. Je nach verfügbarer Spermamenge konnte so eine Suspensionslösung von 40 - 300 ml gewonnen werden.

Nach Immobilisation der Zellen durch 3 Minuten langes Einleiten von CO_2 -Gas wurde die Suspensionslösung allmählich an der Kathodenseite (oberhalb des Auffangröhrchens Nr. 36) in die vertikal stehende Trennkammer (50 x 50 x 0,5 cm) eingepumpt. Die in 50 Reagenzgläsern aufgefangenen Spermienfraktionen enthalten entsprechend der elektrischen Ablenkung während ihrer Wanderung durch die Trennkammer unterschiedliche Spermienkonzentrationen. Diese Erscheinung wiederholte sich in mehreren Vorversuchen und bestätigte das Ergebnis von SANDER (21). Als Beispiel sei auf das Verteilungsprofil der Abb.5 verwiesen.



Abb.5: Häufigkeitsverteilung der Spermien in den Auffangröhrchen

Die genauen Versuchsdaten sind in Tab.2 zusammengefaßt.

Tab.2: Versuchsbedingungen bei den 10 Hauptversuchen

	Versuch				
	I	II	III	IV	V
<u>SUSPENSION:</u>					
Menge in ml	40	100	70	150	140
Spermien in Mill/ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Immobil.-Dauer in min	3	3	3	3	3
<u>ELEKTROPHORESE:</u>					
Spannung in kV	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Stromstärke in mA	123	123	123	123	123
Temperatur in °C	20±0,5	20±0,5	20±0,5	20±0,5	20±0,5
Spermienalter p.E.	10h00'	3h30'	6h20'	4h00'	19h20'
Trenndauer	1h20'	2h45'	2h10'	3h25'	3h05'
	Versuch				
	VI	VII	VIII	IX	X
<u>SUSPENSION:</u>					
Menge in ml	150	120	120	150	300
Spermien in Mill/ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Immobil.-Dauer in min	3	3	3	3	3
<u>ELEKTROPHORESE:</u>					
Spannung in kV	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Stromstärke in mA	123	123	123	123	123
Temperatur in °C	20±0,5	20±0,5	20±0,5	20±0,5	20±0,5
Spermienalter p.E. bei Dosierungsbeginn	22h30'	4h45'	8h30'	6h10'	3h00'
Trenndauer	3h10'	3h00'	3h15'	3h15'	5h25'

Da die auf den Objektträgern fixierten und gefärbten Spermien nur ca. zwei Stunden lang auswertbar blieben, war es im Interesse einer schnellen Weiterverarbeitung und Untersuchung erforderlich, die 50 Auffangröhrchen zu wenigen Fraktionen zusammenzufassen. Dies geschah bei den 10 Hauptversuchen nach folgendem Schema:

Fraktion:	A	Röhrchen Nr.:	1 - 5
	B		6 - 15
	C		16 - 20
	D		21 - 25
	E		26 - 28
	F		29 - 31
	G		32 - 35

Die an Anode (Röhrchen-Nr. 1-5) und Kathode (Röhrchen-Nr. 36-50) aufgefangenen Fraktionen wurden nicht berücksichtigt, weil dort die Spermienkonzentration zu gering war. Lediglich ein Versuch (Versuch X) ergab auszählbare Zellmengen in den Röhrchen 1-5.

Wegen zahlreicher technischer Störungen der Apparatur und anfänglicher Fehler bei der Versuchsdurchführung, die durch mangelnde Übung im Umgang mit dem Gerät bedingt waren, konnten von den 15 durchgeführten Trennversuchen nur 10 ausgewertet werden.

III. Darstellung des Y-Chromosoms nach der Elektrophorese

Um eine genügend große Anzahl der morphologisch auszuwertenden Spermien auf dem Objektträger zu gewährleisten, ergab sich die Notwendigkeit, ihre Konzentration zu erhöhen. Dies geschah durch 5 Minuten langes Zentrifugieren des Inhalts der zu einer Fraktion vereinigten Röhrchen bei 1 500 U/min. Wie Vorversuche zeigten, kristallisiert der Kammerpuffer bei anschließender Lufttrocknung auf dem Objektträger aus und verdeckt dadurch die Spermien. Man verhindert diese Erscheinung am günstigsten, indem man das gewonnene Material mehrmals mit der unter B III d genannten Phosphatpufferlösung auswäscht und nochmals zentrifugiert. Mit der Wasserstrahlpumpe wurde der Überschuß bis auf ca. 0,5 ml abgesaugt und davon die Hälfte auf entsprechend entfettete Objektträger A - G aufgetragen. Nach ein- bis zweistündiger Lufttrocknung wurden die Präparate in unverdünntem Äthanol 20 Minuten lang nachfixiert und anschließend in einer 0,5%igen Atebrinlösung ebensolange gefärbt. Schließlich wurden die Objektträger 2 - 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült und in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Mikroskopieren deckte ich die jeweils auszuwertenden Präparate mit der auch zum Auswaschen benutzten Pufferlösung ein. Vorversuche hatten dies als die günstigste Methode erwiesen, um erstens ein vorzeitiges Austrocknen zu verhindern und zweitens eine möglichst geringe Schichtdicke zu erzielen. Im wesentlichen hielt ich mich bei der Färbemethode an die Angaben von PEARSON (19), CRAMER (8) und PAWLOWITZKI (17).

Die zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung benutzte Optik bestand aus einem Okular mit 10-facher und einem Öl-immersionsobjektiv mit 96-facher Vergrößerung. Es wurden bei willkürlich bewegtem Objektträgertisch pro Präparat 50 durch das Gesichtsfeld wandernde Spermien beurteilt.

Die 10 Hauptversuche zeigten folgendes Ergebnis: Während der elektrophoretischen Auftrennung der Zellen wurden die an der Kathodenseite eingeleiteten Spermien bei ihrer Wanderung durch die Trennkammer entsprechend ihrer Größe und Membranladung verschieden weit zur Anode hin abgelenkt (Abb.6). (S.18)

Vor allem veranschaulicht die dargestellte Kurve, daß sich das Verhältnis von Androspermien zu Gynäkospermien mit zunehmender Entfernung zur Anode hin zugunsten der Y-Chromosomen-Träger verschiebt.

In Tabelle 3 sind die Auszählergebnisse der 10 Hauptversuche ersichtlich (graphische Darstellungen siehe Anhang Abb. 1 - 10).



Abb.6: Durchschnittliche Verteilung der Spermien mit F-body in % aus 10 Hauptversuchen nach elektrophoretischer Auftrennung

Tab. 3: Anzahl der Spermien mit F-body von 50 ausgezählten Samenzellen

VERSUCH	FRAKTION						
	A	B	C	D	E	F	G
I	-	-	19	2	5	12	2
II	-	19	16	6	7	10	14
III	-	-	28	12	10	3	19
IV	-	-	18	12	12	4	15
V	-	16	21	14	25	12	6
VI	-	34	33	23	24	-	6
VII	-	40	35	30	20	16	30
VIII	-	40	36	35	19	18	35
IX	-	22	29	22	11	10	15
X	8	25	25	13	8	14	22
Durchschnitt:	8	28,0	26,0	16,9	14,4	11,0	16,4

Im Hauptversuch X wurde zusätzlich zum Anteil der F-body-Träger auch die Gesamtspermienmenge in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Dabei ergaben sich die in Abb. 7 dargestellten Verteilungsprofile (S. 20)

Aus der Summe der Fraktionswerte A - G errechnet sich ein Gesamtverhältnis der X- und Y-Chromosomentragenden Spermien von 2 zu 1.

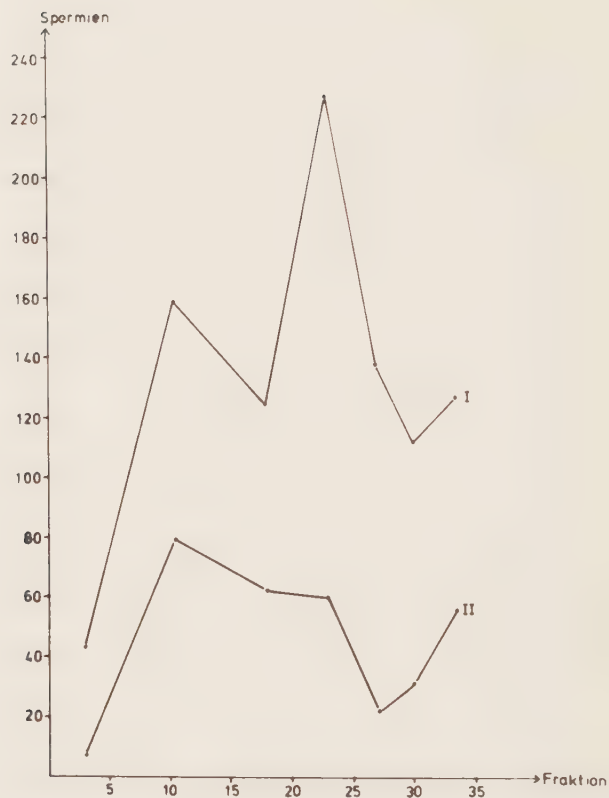


Abb.7: Häufigkeitsverteilung der Gesamtspermien (I) und Spermien mit F-body (II) nach elektrophoretischer Auftrennung

D. DISKUSSION

In der Literatur werden zwei Substanzen zur Fluoreszenzfärbung des F-body's beschrieben: Quinacrine dihydrochloride (Atebrin) und sein Derivat quinacrine mustard.

Das mir zur Verfügung gestellte Atebrin der Fa. Bayer-Leverkusen hatte sich in Vorversuchen als für unsere Zwecke völlig ausreichend erwiesen. Die Darstellung des F-body's gelang eindeutig und klar. Beim Vergleich angefärbter nativer Spermien mit solchen, die vor der Färbung der elektrophoretischen Auftrennung unterworfen waren, zeigten sich morphologisch und färberisch keine Unterschiede.

Auch die Beweglichkeit der Spermien scheint durch die Elektrophorese wenig geschädigt zu werden. Während der lichtmikroskopischen Auszählung ungefärbter Samenzellen konnte man nämlich beobachten, daß einzelne - infolge Nachlassens der Immobilisationswirkung - ihre autonome Beweglichkeit zurückerlangten. Damit bestätigen sich die Befunde der postelektrophoretischen Vitalitätsmessungen von SANDER (21).

Hauptergebnis meiner Untersuchungen ist ein starker Konzentrationsanstieg der Spermien mit einem F-body zur Anodenseite hin. Wie die einzelnen Hauptversuche zeigen, wiederholt sich diese Erscheinung trotz starker Schwankungen der Einzelwerte im Prinzip jedesmal. Hieraus ergeben sich einige wichtige Überlegungen. Die Formel für die Wanderungsgeschwindigkeit von Teilchen im elektrischen Spannungsfeld lautet:

$$v = \frac{e \cdot H}{6 \pi \cdot \eta \cdot r}$$

Hierbei ist e die elektrische Ladung des abgelenkten Teilchens, r der Radius, H die Feldstärke und η die Viskosität des umgebenden Milieus.

Bei den Versuchsbedingungen waren H und η konstant. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Spermien hing also nur von den Faktoren e und r ab. Dabei muß man noch berücksichtigen, daß die elektrische Ladung in dem vorhandenen Milieu nicht voll zur Auswirkung kommt, da Salze anwesend sind. Diese Salze lagern sich entsprechend ihrer elektrischen Ladung als Ionen an die elektrophoretisch bewegten Teilchen an. Dadurch vermindern sie die durch die Ladung e eigentlich zu erwartende Wanderungsgeschwindigkeit. Daher ist der Auswirkung des Faktors e eine geringere Bedeutung beizumessen. Dementsprechend muß sich der Faktor r um so stärker auswirken. Das bedeutet wiederum: Die an der Kathode eingeleiteten Spermien legen während ihrer Wanderung durch das elektrische Feld einen Weg zurück, dessen Ablenkung umgekehrt proportional zu ihrer eigenen Größe ist. Demnach müßten aufgrund meiner Untersuchungen die meisten F-body-tragenden Spermien kleiner sein als die übrigen Zellen.

Phasenkontrastmikroskopisch konnten wir aber in Vorversuchen eine entsprechende Verteilung der klein- und großköpfigen Spermien - wie vor uns SANDER - nicht sichern. Dagegen fiel bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung auf, daß auch einige große Spermienköpfe eindeutig F-bodies enthielten (Abb.8). Ebenso traten Spermien mit und ohne F-body in gleicher Größe auf (Abb.9).

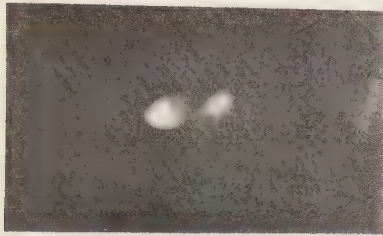


Abb.8: Zwei F-body-tragende Spermien unterschiedlicher Größe

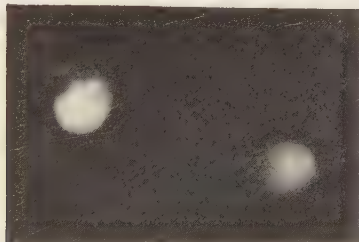


Abb.9: Ein Spermium mit und ein Spermium ohne F-body gleicher Zellgröße

Damit ist die von SHETTLES geäußerte morphologisch orientierte Theorie, daß sich Andro- und Gynäkospermien aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe auftrennen lassen, nicht widerlegt; zumindest muß aber betont werden, daß die licht-, phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung eines Spermiums allein nach der Größe des Spermienkopfes keine Entscheidung über das darin enthaltene Gonosom erlaubt.

Trotz der im Kammerpuffer enthaltenen Salze könnte eine stärkere Ablenkung der Y-Chromosomen-Träger nicht als Effekt der Zellgröße, sondern als Folge einer größeren negativen Ladung pro Flächeneinheit der Zellmembran zustandekommen. Auch dann müßte die Häufigkeit der Androspermien zur Anodenseite hin zunehmen. Das ist in unseren 10 Hauptversuchen (Abb.6) der Fall. Zwar finden sich in der am nächsten zur Kathode entnommenen Fraktion G relativ mehr Y-Körper (33%) als in der anodenwärts anschließenden Fraktion F (22%); aber auch dieser Wert (33%) liegt noch deutlich unter dem Durchschnittswert (43%), der im nicht elektrophoretisch behandelten Ejakulat gefunden wird. Das kurze Ansteigen der Kurve in Kathodennähe kann vielleicht durch die dort - wie bei der Auftrennung von Blutzellen (15) - zahlreich vorhandenen Zelltrümmer erklärt werden.

Als Ursache für den unterschiedlichen Verlauf der einzelnen Kurven (I-X) sind in erster Linie technische Unzulänglichkeiten der Elektrophoreseapparatur zu nennen: Konglomeratbildung von Spermien bzw. Schleimsubstanzen führten wiederholt zur Verstopfung einzelner Förderungsschläuche, wobei während des Versuchsablaufes nur sehr begrenzte Kontrollmöglichkeiten bestanden.

Darüber hinaus könnten differente Aufbewahrungs-, Transport- und Bearbeitungszeiten der Spermaproben post ejaculationem infolge Veränderung der Membraneigenschaften Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsergebnissen bewirkt haben. Die gleiche Tendenz der Verteilung ist trotzdem nicht zu übersehen.

Auch zur Frage der Immobilisation muß einiges bemerkt werden: Der Einfachheit halber wurde mit CO_2 immobilisiert. Diese Methode entspricht auch am ehesten den physiologischen Verhältnissen. Ihr Effekt ist durch O_2 -Zufuhr voll reversibel. Sie hat aber den Nachteil, daß pH-Wert-Schwankungen auftreten, welche die elektrophoretische Wanderungsrichtung und Geschwindigkeit beeinflussen können. Bedingt durch die relativ lange Versuchsdauer ist außerdem ein Wiedererlangen der autonomen Beweglichkeit eines Teiles der Samenzellen nicht ganz auszuschließen.

Weiterhin muß man berücksichtigen, daß während der ersten Versuchsphase - wegen der Widerstandsänderungen beim Einleiten der Suspensionslösung - die Stromstärke zu schwanken beginnt und erst nach etwa 30 Minuten konstant bleibt.

Die einzelnen Präparate B - G stellen ferner jedes für sich einen Mittelwert aus mehreren benachbarten Fraktionen dar (s. C II). Theoretisch wäre es möglich, daß durch Zusammenfassung mehrerer Werte kleinere zusätzliche Peaks der Kurve (Abb.6) verdeckt werden. Diese Maßnahme erwies sich aber als notwendig, da in den 50 einzelnen Auffangröhrchen die Spermienausbeute zum Auszählen zu gering war. Sicher hätte man bei längerer Trenndauer eine größere Ausbeute erzielt. Dazu reichte jedoch die Spermamenge im allgemeinen nicht aus; die Zeit mußte deshalb auf etwa 3 Stunden beschränkt bleiben. Lediglich ein Ejakulat ließ eine Trenndauer von 5 Stunden 25 Minuten zu. Dieser Versuch ergab auszählbare Zellmengen auch in den ersten 5 Auffangröhrchen, die zu einer gesonderten Fraktion (A) zusammengefaßt wurden (s. Tab.3: Versuch X).

Die Gesamtcharakteristik der Verteilung blieb dabei erhalten.

Bei der Auswertung der gewonnenen Präparate traten ebenfalls Schwierigkeiten auf: Zunächst müßte man sich längere Zeit mit dem Fluoreszenzmikroskop einarbeiten. Beim Durchmustern der Präparate stieß man immer wieder auf stark fluoreszierende Körper, die nicht mit den Spermien zu tun hatten. Hierbei handelte es sich häufig um Kristalle, welche sich aus dem Kammerpuffer bzw. der Suspensionslösung bilden. Sie geben bei ungünstiger Lage und Form dem ungeübten Beobachter Anlaß zur Verwechslung mit F-bodies. Auch fluoreszieren Teile von Bakterien, die nach Größe, Form und Fluoreszenz den F-Körpern ähneln (Abb.10).

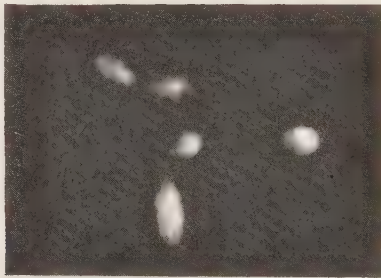


Abb.10: Spermium mit F-body (rechts) und Bakterien

Mit zunehmendem Alter der Spermien post ejaculationem scheinen sich die deutlich fluoreszierenden F-bodies in mehrere kleine fluoreszierende Teilchen "aufzulösen" (Abb.11) und lassen keine eindeutige Diagnose mehr zu. Die hierdurch bedingte Ungenauigkeit sollte bei künftigen Versuchen dadurch vermieden werden, daß mehrere Personen bei der Versuchsdurch-

führung, insbesondere aber der Auszählung mitarbeiten. Die so erzielte Zeitersparnis würde erlauben, daß die Präparate ausgezählt sind, bevor die genannte Erscheinung einsetzt.

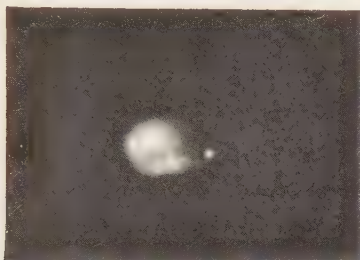


Abb.11: Spermien mit "zerfallendem" F-body

Eine weitere, die Genauigkeit der Untersuchung beeinträchtigende Tatsache ist das allmähliche Verblassen der F-bodies während der Betrachtung. Dieser Vorgang spielt sich innerhalb weniger Minuten ab und zwingt daher zu sehr zügiger Auszählung. Hierin könnte die Erklärung liegen für den gegenüber Nativsperma (43%) geänderten Anteil der F-body-Träger in der Gesamtspermienmenge nach der Elektrophorese (34%)!

Schließlich: Um den Einfluß der zuletzt genannten Fehlerquellen auf das Ergebnis zu ermitteln, wurden einige Präparate durch verschiedene Kontrollpersonen unabhängig voneinander beurteilt. Die Kontrollpersonen hatten sich einige Zeit "eingesehen". Trotzdem wich das Ergebnis auffallend von dem eigenen ab. Es folgt daraus, daß eine gewisse Subjektivität bei der Entscheidung, ob ein F-body vorliegt oder nicht, in Kauf genommen werden muß. Dabei handelt es sich um ein Problem,

das auch in der übrigen Labordiagnostik bekannt ist. Zur Sicherung äquivalenter Befunde werden deshalb nur die eigenen Beobachtungen miteinander verglichen.

Abschließend ist festzustellen:

Die relativ geringe Anzahl von 10 ausgewerteten Hauptversuchen und die genannten Unsicherheitsfaktoren bei der Durchführung und Auswertung lassen eine quantitativ-statistische Aussage nicht zu. Wenn trotz aller dieser Fehlerquellen die Kurven der 10 Hauptversuche einen einheitlich charakterisierbaren Verlauf und eine signifikante Zunahme der Spermien mit nachgewiesenem F-body zur Anode hin zeigen, so spricht diese Tatsache aber für sich. - Wie das der Erwartung entgegengesetzte Gesamtverhältnis von Spermien mit F-body zu Spermien ohne F-body zu erklären ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, Spermien mit der trägerfreien, kontinuierlichen, präparativen, vertikalen Hochspannungselektrophorese zu trennen, Teile des Y-Chromosoms (F-body) fluoreszenzmikroskopisch darzustellen und zu untersuchen, ob die Auftrennung nach männlich und weiblich bestimmenden Samenzellen stattfindet. In zehn Hauptversuchen zeigte sich:

1. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Y-Chromosoms in Spermien ergab ein Verhältnis von 40 - 45% F-body tragender Zellen. Diese Befunde stimmen mit den Erfahrungen anderer Autoren überein.
2. Auch nach hochspannungselektrophoretischer Auftrennung der Spermien ließ sich das F-body durch Atebrinfärbung fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machen und auszählen.
3. Dabei ergibt die Analyse der Auffangfraktionen, daß von der Kathode zur Anode hin der Anteil der F-Körper tragenden Samenzellen zunächst zwar von 33% auf 22% sinkt, um dann stetig bis zu 56% anzusteigen. Bei einem Anteil von ca. 43% Androspermien im Nativpräparat bedeutet dieses Ergebnis, daß bei den gegebenen Versuchsbedingungen die Androspermien vorwiegend zur Anode wandern.

F. ANHANG

Die Abbildungen 1 - 10 stellen die prozentuale Verteilung der Spermien mit F-body aus den zehn Hauptversuchen dar.

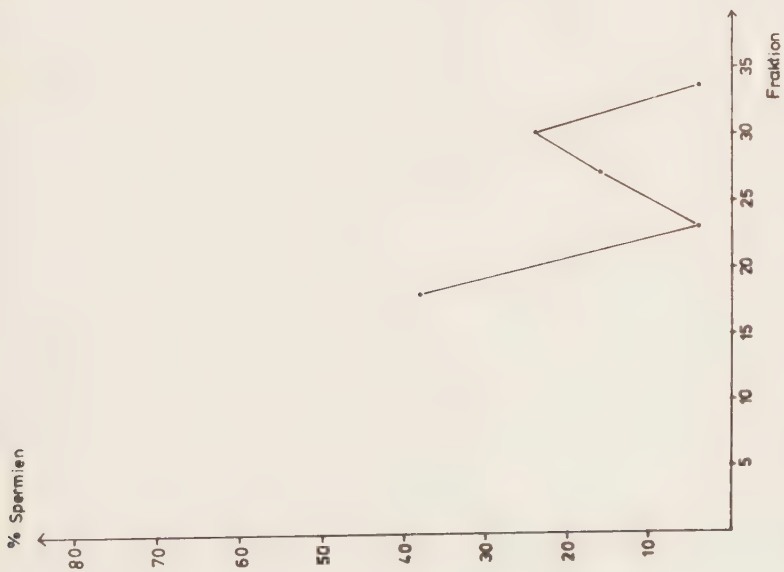


Abb.1: Versuch I

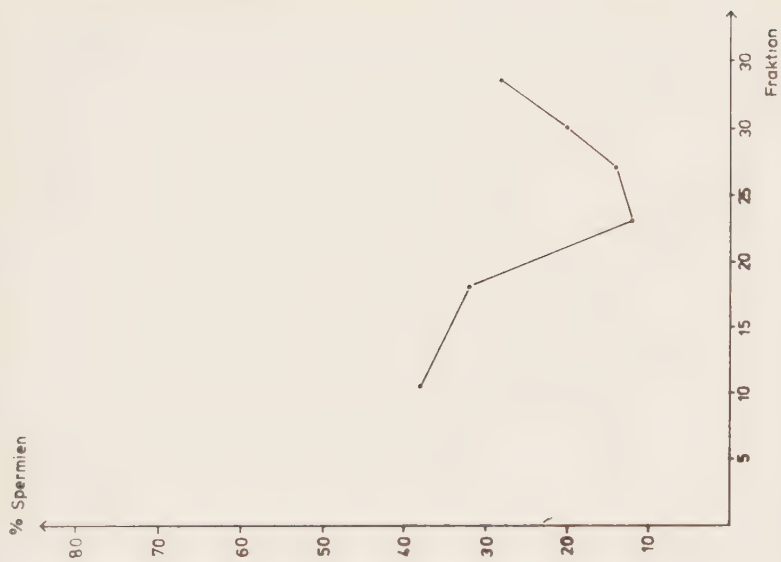


Abb.2: Versuch II

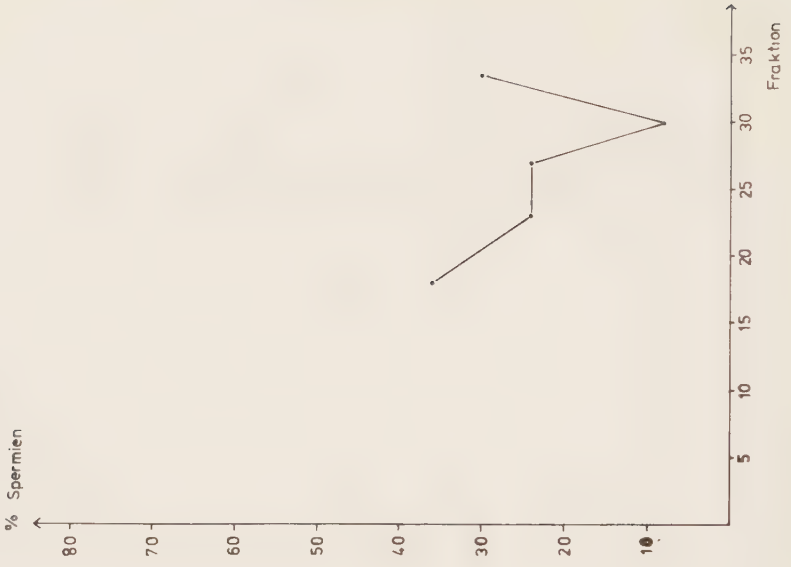


Abb.4: Versuch IV

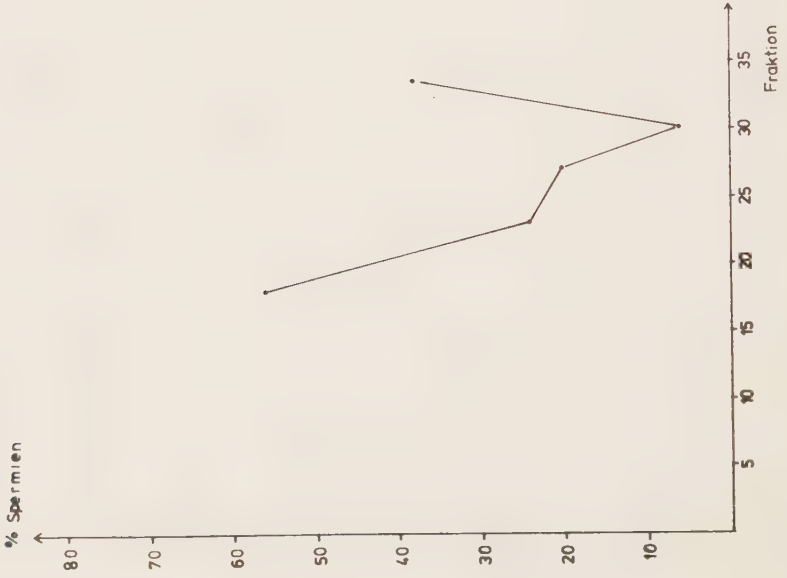


Abb.3: Versuch III

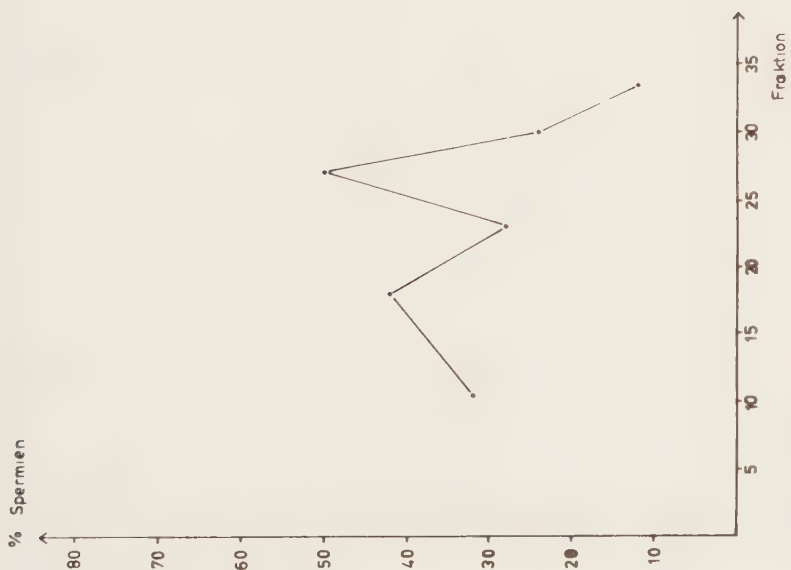


Abb. 5: Versuch V

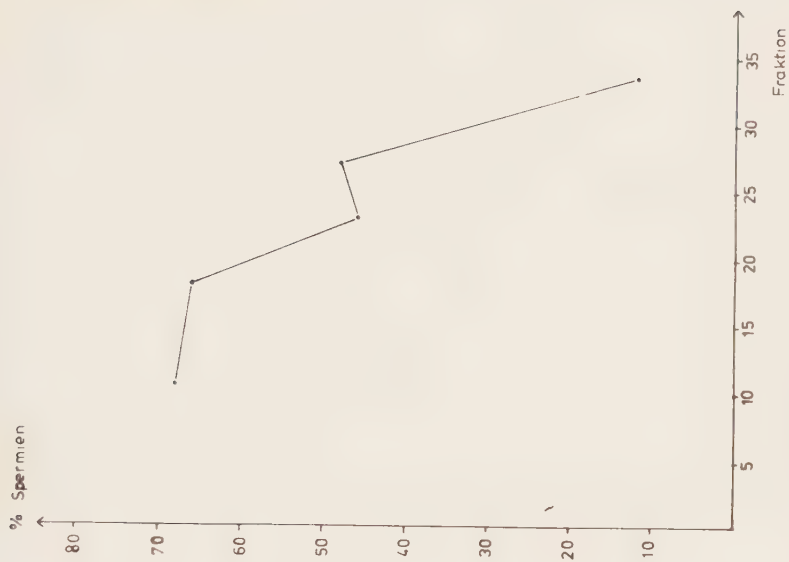


Abb. 6: Versuch VI

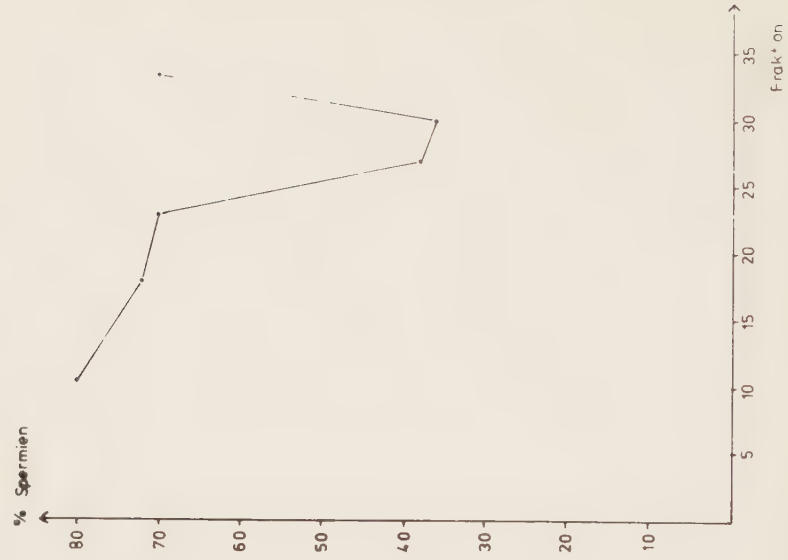


Abb.8: Versuch VIII

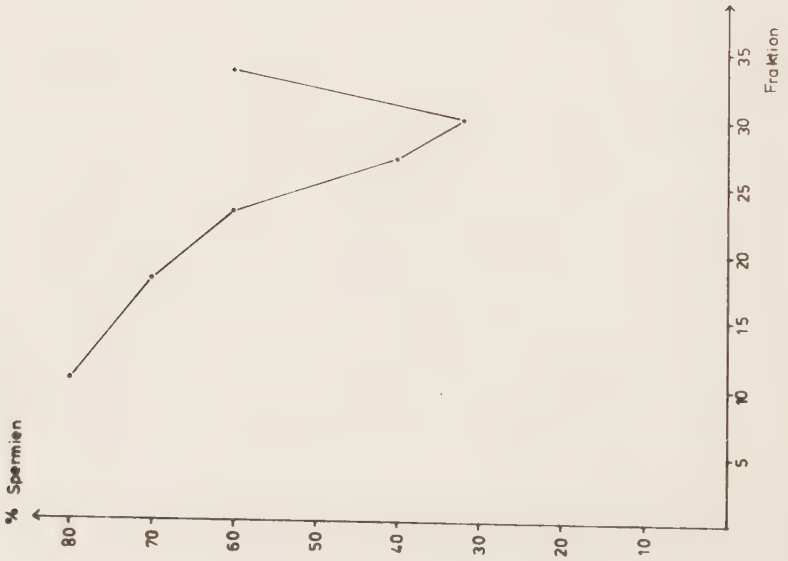


Abb.7: Versuch VII



Abb.10: Versuch X



Abb.9: Versuch IX

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARLOW, P., C.G.VOSA: The y-chromosomes in human spermatozoa.
Nature 226, 961-962 (1970)
2. BEDFORD, J.M. et al.: Failure of sperm sedimentation to influence the sex ratio of rabbits.
J.Reprod.Fertil. 14, 167-170 (1967)
3. BENEDICT, R.: Density gradient centrifugation of mammalian spermatozoa.
P.D.Thesis Univ.of Pensylv. (1964)
4. BHATTACHARYA, B.C., A.B.BANGHAM, R.C.CRO, R.D.KEYNES: An attempt to predetermine sex of calves by artificial insemination with spermatozoa separated by a sedimentation.
Nature 211, 863 (1966)
5. BRIDGES, C.B.: The genetics of sex in drosophila and internal secretions.
1 sd., ed., E.ALLEN, Ed.,
The WILLIAMS and WILKINS Co. (1932)
6. BÜHLER, E.M., H.MÜLLER, G.R.STALDER: Further evidence for the localization of the male determining factors on the short arm of the Y-chromosome.
Excerpta Medica 233, 116 (1971)
7. CASPERSSON, T., L.ZECH, C.JOHANSSON, E.J.MODEST: Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents.
Chromosoma 30, 215 (1970)
8. CRAMER, H. Persönliche Mitteilungen (1971).
9. GEORGE, K.P.: Cytochemical differentiation along human chromosomes.
Nature 226, 80-81 (1970)

10. KUHR-DOHMEN, C.: Dissertation, Marburg (1970)
11. LEWIN, S.: The use of electrophoresis for sex control.
Mem.Soc.Endocrinology 7, 100 (1960)
12. LINDAHL, P.E.: Separation of bull spermatozoa carrying x and y-chromosomes by counter-streaming centrifugation.
Nature 181, 784 (1958)
13. MODEST, E.J., S.K.SENGUPTA: The chemical background for the fluorescence analysis of chromosomes.
Excerpta Medica 233, 447 (1971)
14. NEVO, A.C., I.MICHAELI, H.SCHINDLER: Electrophoretic properties of bull and rabbit spermatozoa.
Exp.Cell.Res. 23, 69-83 (1961)
15. OEPEN, H.: Zelltrennung im trägerfreien Medium als Methode der Cytogenetik.
1.Tagung der Gesellschaft für Anthropologie und Humangenetik,
Königstein 1967
16. PAWLOWITZKI, I.H., P.PEARSON: Vortrag gehalten auf der 12.Tagung der Gesellschaft für Anthropologie und Humangenetik.
Göttingen 29.-31. März 1971
17. PAWLOWITZKI, I.H.: Persönliche Mitteilungen (1971).
18. PEARSON, P.L., M.BORBOW: Definitive evidence for the short arm of the y-chromosome associating with the x-chromosome during meiosis in human male.
Nature 226, 959-961 (1970)

19. PEARSON, P.L., M. BOBROW, C.G. VOSA:
Technique for identifying y-chromosomes in human nuclei.
Nature 226, 78-89 (1970)
20. PEDERSON, H.:
Ultrastructure of the ejaculated human sperm.
Z. Zellforsch. 94, 542-554 (1969)
21. SANDER, R.
Dissertation, Marburg (1970)
22. SCHILLING, E.:
Experimentelle Untersuchungen zur Geschlechtsbestimmung beim Rind.
Naturwissensch. 52, 353 (1965)
23. SCHILLING, E.:
Experiments in sedimentation and centrifugation of bull spermatozoa and the sex ratios of born calves.
J. Reprod. Fertil. 11, 469-472 (1966)
24. SCHILLING, E., P. SCHMID: Unterschiedliche Geschwindigkeit leichter und schwerer Spermien im Ejakulat.
Naturwissensch. 54, 291-292 (1967)
25. SEVING, A.:
Experiments on sex control by electrophoretic separations of spermatozoa in the rabbit.
J. Reprod. Fertil. 16, 7-14 (1968)
26. SHETTLES, L.B.:
Human spermatozoa shape in relation to sex ratios.
Fertil. Steril. 12, 502-508 (1961)
27. SHETTLES, L.B.:
Sperm shape and sex ratios.
Bul. Sloane Hosp. Wom. 7, 74-77 (1961)
28. VESSELINOVITCH, S.D.:
Microelectrophoresis of bovine spermatozoa.
Corn. Vet. 49, 359-373 (1959)
29. VESSELINOVITCH, S.D.:
Electrophoresis of spermatozoa and sex control.
Corn. Vet. 50, 326-330 (1960)

30. ZECH, L.:

Investigation of metaphyse chromo-
somes with DNA-binding fluoro-
chromes.

Exp.Cell.Res. 58, 463 (1969)

Herrn Professor Dr. med. H. OEPEN danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Hilfe.

Ebenso gilt mein Dank Frau GRIMM (Institut für Humangenetik) für ihre Unterstützung bei der Versuchsdurchführung, Herrn Dr. SCHULZE (Andrologische Abteilung der Dermatologischen Universitätsklinik Marburg) für die Bereitstellung der Spermaproben, den Herren Dozenten Dr. CRAMER (Institut für Humangenetik Marburg), Dr. PAWLOWITZKI (Institut für Humangenetik Münster), Professor Dr. ROHEN und Professor Dr. CASTENHOLZ (Anatomisches Institut) für ihre Hilfe bei der Auswertung der Versuche und Frau MLODZIK (Institut für Humangenetik) für die fotografische Herstellung der Grafiken.

Lebenslauf

Am 6. Juli 1947 wurde ich, Elfi Mesenbrink, geb. Mende, in Recklinghausen als zweites Kind des Oberlandesgerichtsrates Gottfried Mende und seiner Ehefrau Wilhelmine Mende, geb. Hassels, geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Hochlarmark bei Recklinghausen, von 1958 bis 1959 das naturwissenschaftlich-mathematische Gymnasium in Herten und von 1959 bis 1967 den naturwissenschaftlich-mathematischen Zweig der Wilhelm-von-Oranien-Schule in Dillenburg, wo ich am 19. Juni 1967 das Reifezeugnis erhielt.

Nach einem Semester Volkswirtschaft an der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn wechselte ich 1968 zur Naturwissenschaftlichen Fakultät über und erhielt im Sommer 1968 die Zulassung zum Studium der Zahnheilkunde. Im März 1969 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und legte am 3. Oktober 1970 die zahnärztliche Vorprüfung ab.

Am 8.8.1969 heiratete ich den Zahnarzt Dietmar Mesenbrink.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Frauen und Herren Professoren und Dozenten:

Aurich, Bernhardt, Bock, Denecke, Dimroth, Goebell, Haan, Hennis, Hering, Heuser, Hort, Karlson, Koecke, Korb, Jahnke, Mahr, Niemeyer, Nöth, Oehmig, Pantke, Petry, Pfütz, Riecken, Rohen, Rosemann, Rupec, Schiff, Schmidt, Schnell, Seidel.

